

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
BRUNA VARGAS ANDRIOLLI

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS
DE *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (Lamiaceae)**

Curitibanos

2016

BRUNA VARGAS ANDRIOLLI

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS
DE *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (Lamiaceae)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do Campus de Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Lício Luiz Dal Vesco

Coorientador: Prof. Dr. Cristian Soldi

Curitibanos

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Andriolli, Bruna Vargas

Morfogênese in vitro e avaliação dos compostos voláteis
de Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel. (Lamiaceae) /
Bruna Vargas Andriolli ; orientador, Lírío Luiz Dal Vesco;
coorientador, Cristian Soldi. - Curitibanos, SC, 2016.
27 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Cultivo in vitro. 3. Compostos
voláteis. 4. SPME. 5. Lavanda. I. Dal Vesco, Lírío Luiz.
II. Soldi, Cristian. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Agronomia. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

Bruna Vargas Andriolli

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS
DE *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (Lamiaceae)**

Este trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 18 de novembro de 2016.

Prof. Dr. Samuel L. Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cristian Soldi
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A meus **pais e irmão**, pelo constante incentivo, apoio e paciência a mim dedicados. A minha mãe, pelas palavras de carinho e encorajamento. A meu pai, pelas instruções e suporte. A meu irmão por tornar minha vida mais completa.

Um agradecimento especial a meu orientador **Drº. Profº. Lírío Luiz Dal Vesco** que é muito mais do que um exemplo de profissional para mim e sim um exemplo de pessoa para a vida, cujo incentivo, ensinamento e principalmente confiança, foram fundamentais para minha permanência e conclusão do curso.

A meu coorientador **Drº. Profº. Cristian Soldi**, por toda a dedicação, colaboração, ensinamento e paciência na realização desse trabalho.

A professora **Dra. Dilma Budziak**, sempre disposta a ajudar com a presente pesquisa.

Aos professores **Drs. Adriana Terumi Itako e Paulo Cesar Poeta Fermino Junior**, pelas inúmeras dicas e conversas que de alguma forma colaboraram com a jornada.

Aos técnicos **Renata Almeida Schmidt e Gabriel Felip Gomes Olivo**, cujo apoio, prestatividade e convivência tornaram meus dias mais agradáveis.

A **Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)** e ao campus de Curitibanos, pela oportunidade e suporte financeiro.

Meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de microextração em fase sólida. A) Sorção dos compostos voláteis; B) Dessorção no injetor do CG.....	15
Figura 2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Lavandula x intermedia</i> Emeric ex Loisel. para extração e análise do perfil químico.....	17
Figura 3. Porcentagem de tubos de ensaio contaminados por bactéria durante o período de subcultivo <i>in vitro</i> da <i>Lavandula x intermedia</i>	18
Figura 4. Número médio de brotos de <i>Lavandula x intermedia</i> em resposta aos tratamentos que consistem de duas formulações salinas (MS e QL) combinadas com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM), após quatro semanas de subcultivo.....	19
Figura 5. Altura média (cm) de brotos de <i>Lavandula x intermedia</i> em resposta aos diferentes tratamentos do meio de cultura: duas formulações salinas (MS e QL) combinadas com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM), após quatro semanas de subcultivo.....	20
Figura 6. Cromatograma revelando os principais componentes voláteis detectados por SPME das brotações da planta matriz.....	22
Figura 7. Cromatograma revelando os principais componentes voláteis detectados por SPME das brotações induzidas em tratamento QL (1,5 μM BAP).....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem relativa dos componentes majoritários identificados em cada amostra de compostos voláteis extraídos por SPME.....	21
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

Atm – Pressão atmosférica

BAP – 6-benzilaminopurina

CG-MS – Gas Chromatography Mass Spectrometry

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

LAMAI – Laboratório multiusuário de análise instrumental

MS – Formulação salina (Murashige e Skoog, 1962)

PDMS – Polidimetilsiloxano (Fibra comercial de SPME)

pH – Potencial de Hidrogênio

QL – Formulação salina (Quoirin et al., 1977)

SNK – Student-Newman-Keuls

Splitless – Sem divisão de fluxo

SPME - Solid Phase Microextraction

μM – Micro Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 MATERIAL VEGETAL E AMBIENTE DE CULTIVO	13
2.2 INDUÇÃO A PROLIFERAÇÃO DE BROTO	13
2.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS PARA ANÁLISE DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS EM HEXANO	14
2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR SPME	14
2.5 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS POR CGMS	15
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 MORFOGÊNESE IN VITRO	17
3.2 EXTRAÇÕES E ANÁLISES DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	20
4 CONCLUSÕES	24
Abstract	25
REFERÊNCIAS	26

Morfogênese *in vitro* e avaliação dos compostos voláteis de *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (Lamiaceae)

Bruna Vargas Andriolli

Resumo

O gênero *Lavandula* conta com mais de 30 espécies e possui as variedades de plantas de maior importância mundial na extração do óleo essencial. Atualmente nota-se que o interesse por plantas medicinais e aromáticas com substâncias biologicamente ativas vem crescendo bastante. Porém algumas espécies sintetizam metabólitos secundários em concentrações muito baixas ou apresentam grande variabilidade genética e de atividades fisiológicas, respondendo diferentemente às condições ambientais, com alterações nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de material padronizado. Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido consideradas como processos de alto potencial, já que viabilizam a padronização das condições ambientais de cultivo, garantindo constância na obtenção de metabólitos secundários. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. sob diferentes condições de cultivo *in vitro*, bem como realizar a identificação e comparação do perfil químico dos voláteis emitidos das brotações *in vitro* desenvolvidas, com o sistema *ex vitro* de produção, quando submetidas a diferentes métodos de extração.. O experimento foi conduzido no Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina. Utilizou-se um bifatorial contendo 8 tratamentos: duas formulações salinas (MS e QL) combinadas com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) para organogênese direta (OD). O material vegetal foi submetido à extração com solvente Hexano e SPME, para análise dos compostos químicos em CG-MS. Durante a manutenção das culturas *in vitro* foram avaliadas as características: número e altura (cm) de brotos desenvolvidos. Após realizar as avaliações, notou-se uma contaminação persistente dos explantes, o que sugere que a planta tenha associação com alguma bactéria endógena. A taxa de multiplicação de brotos foi maior no meio de cultura QL (BAP 1,5 μM) quando comparada ao meio MS, porém semelhante aos demais. Não foram obtidas diferenças significativas entre as alturas médias dos brotos, porém nota-se que a ausência de citocinina ao meio tende a um alongamento de entre-nós. A técnica de extração de compostos por solvente Hexano, mostrou-se não ideal para avaliação do perfil químico das brotações analisadas. A metodologia aplicada de SPME gerou resultados satisfatórios quanto a extração de compostos para análise do perfil químico. Os cromatogramas revelaram que os compostos voláteis produzidos pelos brotos de lavanda nas condições *in vitro* e *ex vitro* foram os mesmos. O presente trabalho serve como base inicial para pesquisas posteriores com análise de perfil químico de lavanda.

Palavras chave: Cultivo *in vitro*. Perfil químico. Compostos voláteis. SPME. Lavanda.

1 INTRODUÇÃO

As espécies de lavanda pertencem à família Lamiaceae, que contém aproximadamente 260 gêneros e 6970 espécies. Apresenta ampla distribuição, são cosmopolitas e mais frequentes nas regiões do Mediterrâneo e Oriente Médio. O gênero *Lavandula* com com aproximadamente 30 espécies e seu *habitat* natural é na Europa, África e Ásia (MENDES, 2007). Dentro desse gênero encontram-se as variedades de maior importância mundial na extração do óleo essencial. A variedade Grosso (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) é destaque em área cultivada na região do Mediterrâneo (DAL VESCO et al., 2007).

Conforme relatado por Machado et al. (2013), a lavanda é uma planta de reconhecida importância devido ao óleo essencial contido em suas flores e folhas, que é usado para a fabricação de remédios, perfumes, cosméticos e produtos de limpeza, possui propriedades antisséptica, anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva, antifúngica, antiviral e bactericida, pois é rico em terpenos. Os principais constituintes químicos são linalol, acetato de linalila, limoneno, 1,8- cineol, acetato de citronelila e cânfora (MCGIMPSEY; PORTER, 1999).

Metabólitos secundários de plantas são moléculas conhecidas pelo essencial papel na adaptação das plantas ao seu ambiente e contribuem para interatividade da planta com os diferentes ecossistemas. Essas moléculas representam uma importante fonte de compostos ativos farmacêuticos, pigmentos, fragrâncias, aditivos alimentícios, etc. Contudo, a produção de compostos fitoquímicos, frequentemente envolve a extração da planta viva, a qual necessita, muitas vezes, muito tempo para se desenvolver e pode levar à extinção de espécies nativas (BOUGAUD et al., 2001).

Além disso, algumas espécies sintetizam os metabólitos secundários em concentrações muito baixas o que exige processos de extração onerosos. Outras estão sob grave pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a sua utilização em larga escala ou apresentam grande variabilidade genética e atividades fisiológicas, respondendo de modo diferente às condições ambientais vigentes, com alterações quanti e qualitativas nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de material padronizado (SOARES et al., 2006).

Os processos biotecnológicos, utilizando técnicas *in vitro* rigorosamente controladas para o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais ou de plantas íntegras para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido considerados como sistemas de alto potencial para a superação de muitos problemas encontrados na produção a campo da planta, como

sazonalidade, variação ambiental, localização geográfica e ataque de pragas (GIACOMETTI, 1990).

Metodologias de cultivo *in vitro* possibilitam a padronização das condições ambientais de cultivo, garantindo constância na obtenção de metabólitos secundários a cada subcultivo. Permite ainda a realização da comparação quanti e qualitativa da produção destes compostos com o sistema *ex vitro*, com a possibilidade de produção controlada de acordo com a demanda, contribuindo para a redução dos custos de produção, ou mesmo viabilizando a produção de novas substâncias (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Muitas formas de extração de compostos químicos, empregam grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos, além de que a incorreta manipulação durante a coleta da amostra, transporte e estocagem pode resultar em uma significativa variabilidade nos resultados da análise. Afim de contornar essa problemática, técnicas de preparação de amostras livres de solventes que são baseadas em extração por sorção vêm ganhando a atenção de pesquisadores. Dentre as mais utilizadas, a SPME (Solid phase microextraction) que mostrou ser uma técnica ambientalmente viável em comparação a extração por solventes, tem sido aplicada com sucesso como um dispositivo para amostragem de compostos orgânicos voláteis de amostras biológicas (DE MARTINIS; RUZZENE; MARTIN, 2004).

Entendendo-se que o aprimoramento e o investimento em estudos de produção biotecnológica de plantas medicinais e aromáticas ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, pode levar à obtenção de matérias-primas uniformes e consequentemente alta qualidade de preparados fitoterápicos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o desenvolvimento de *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur sob diferentes condições de cultivo *in vitro*, bem como realizar a identificação e comparação do perfil químico dos voláteis emitidos das brotações *in vitro* desenvolvidas, com o sistema *ex vitro* de produção, quando submetidas a diferentes métodos de extração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E AMBIENTE DE CULTIVO

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Genética, na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos, Curitibanos, SC.

Os meios de cultura utilizados no estabelecimento do cultivo *in vitro* eram compostos pela formulação salina MS (Murashige; Skoog, 1962) adicionados 5 mL L⁻¹ de vitaminas MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de Agar-agar e 0,75 µM de BAP como fitorregulador indutor de brotação, denominado de meio MS básico. Após o ajuste do pH para 5,8, os meios eram transferidos para tubos de ensaio (22 x 150mm) ou frascos do tipo conserva (340 ml) e hermeticamente fechados com papel alumínio e plástico filme e submetidos a autoclavagem a 121 °C, a 1,3 atm., por 15-20 minutos. O processo de inoculação das culturas foi realizado em câmara de fluxo laminar. E as culturas foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de 25 °C ± 2 °C e com fotoperíodo de 16 horas

Segmentos nodais e ápices caulinares (1,5 a 2,5 cm), com um a dois nós, foram excisados de planta matriz de Lavanda (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) mantida em casa de vegetação, com ambiente controlado, na Universidade Federal de Santa Catarina – Campi Curitibanos foram à fonte de explantes para introdução *in vitro*. No processo de desinfecção dos explantes foram utilizados álcool (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (40%) por 15 min e três enxágües em água autoclavada, conforme sugerido por Dal Vesco et al. (2007). Brotos induzidos foram subcultivados a cada 30 dias em novos meios de cultura MS básico.

2.2 INDUÇÃO A PROLIFERAÇÃO DE BROTOS

Para a indução de brotos, os segmentos nodais e ápices caulinares originados de subcultivos a cada 4 semanas, foram a fonte de explantes para o ensaio de multiplicação em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio de cultura. O delineamento experimental foi um bifatorial com oito tratamentos: duas formulações salinas (MS e QL) combinado com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 µM). Cada unidade experimental constitui-se de três tubos de ensaio contendo dois explantes, (0,8 a 1,5 cm) com duas gemas por explante e repetidos três vezes, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Dados de número de brotos, altura de brotos e contaminação foram coletados por 4 semanas. Dados relevantes durante o cultivo foram registrados por fotomicrografia.

2.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS PARA ANÁLISE DOS COMPOSTOS SOLÚVEIS EM HEXANO

Os extratos produzidos foram obtidos a partir das culturas vegetais *in vitro* desenvolvidas por organogênese direta, planta matriz em ambiente controlado e planta de lavanda à campo, através de macerações com o solvente apolar Hexano (C_6H_{14}). Utilizou-se de 0,60 g de brotações cortadas e maceradas por amostra acrescidas de 6 mL de solvente cada, para produção dos extratos, que permaneceram fechados ao abrigo de luz por 24 horas, sendo abertos apenas para a realização de 5 posteriores macerações de 2 min cada.

Um ensaio teste foi realizado para determinação do melhor tempo de extração, nesse experimento os tubos de ensaio permaneceram fechados com o material vegetal imerso em Hexano por 1h, 2h, 3h, 6h, 24h e 96h. A partir desse ensaio que se optou por seguir com as extrações no tempo de 24h, já que mais tempo não alterava as análises e menos tempo não era suficiente para identificação de compostos.

Após o período total de 24h os tubos de ensaio foram abertos e os extratos foram filtrados para retirada do material vegetal, então afim de remover a água dos extratos, acrescentou-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) a cada tubo de ensaio. Um volume de 500 μ L foram pipetados de cada amostra e acondicionados em microtubos de vidro, onde acrescentou-se 1000 μ L de Hexano para diluição. Os microtubos foram devidamente etiquetados e armazenados ao abrigo de luz em congelador até o momento das análises cromatográficas.

2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR SPME

Neste procedimento é empregada uma fibra ótica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero ou adsorvente sólido. Esta fibra ótica, que é uma fase extratora, é acondicionada dentro da agulha de uma microseringa denominada “holder”, para a extração dos analitos. A fibra comercial utilizada foi a PDMS (Polidimetilasiloxano).

Utilizou-se a PDMS no modo “headspace”, na qual a fibra não entra em contato com a amostra, que permanece em frasco fechado e apenas os compostos voláteis são adsorvidos na fibra. Esse processo de extração, ilustrado na figura 1, foi realizado para as amostras de

brotações *in vitro* desenvolvidas nos tratamentos MS + BAP (0 e 1,5 μM), QL + BAP (0 e 1,5 μM) e também para uma amostra de brotações jovens da planta matriz.

Antes de inserir a agulha nos tubos de ensaio, agitou-se manualmente as amostras por cerca de 2 minutos, afim de estressar a planta para liberar os compostos voláteis. A temperatura durante as extrações foi ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e o tempo de adsorção foi de 1h por amostra. Imediatamente após a extração dos analitos pela fibra, os mesmos foram dessorvidos termicamente, pela sua introdução no injetor aquecido a 250°C de um cromatógrafo gasoso para análise do perfil químico de voláteis.

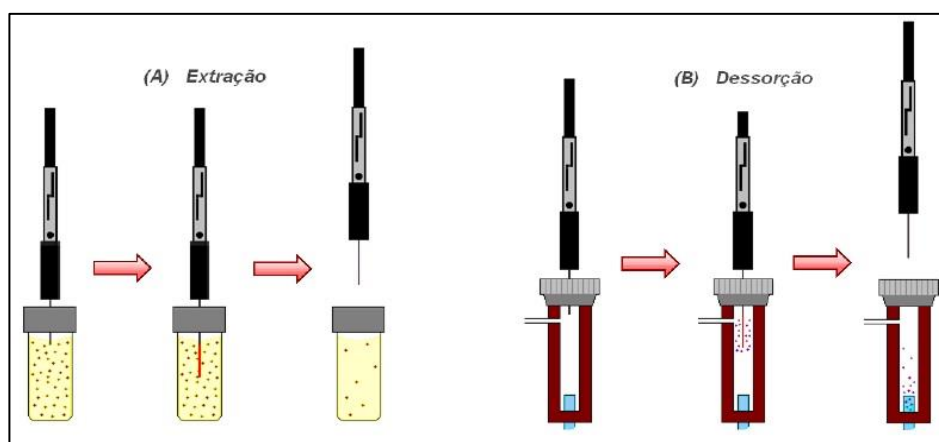


Figura 1. Processo de microextração em fase sólida. A) Sorção dos compostos voláteis; B) Dessorção no injetor do CG.

2.5 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS POR CGMS

As análises cromatográficas das amostras sucederam-se no Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI) do Campus de Curitiba, pela utilização do CG-MS, como indica Simões, 2001. A análise de GC foi realizada em um equipamento da marca Agilent, modelo 7890A, equipado com um processador de dados. E as análises no MS foram realizadas em um equipamento da marca Agilent, modelo 5975C MSD.

A identificação dos componentes foi realizada a partir da fragmentação de suas massas, por comparação dos espectros de massa dos compostos aos espectros das bibliotecas de referência armazenadas na base de dados do MS.

O CG operou no modo “splitless”, as separações cromatográficas ocorreram em coluna capilar HP-5MS 5% Fenil (metil siloxano), com 30m de comprimento, x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura. Utilizou-se temperatura programada de 40°C aumentando 6°C por minuto até 200°C e então aumentando até 280°C (15 minutos), à taxa de

10°C/minuto. A temperatura usada para a fonte iônica e o injetor foram 300°C e 250°C respectivamente. A velocidade do gás de arraste (Hélio) foi de 1,0 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas atuou na voltagem de 70eV.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados quantitativos referentes a produção *in vitro* foram submetidos a teste de normalidade e análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade. A comparação das médias dos tratamentos foi feita pelo teste SNK a 5% de probabilidade, através do programa estatístico ASSISTAT, de acordo com as recomendações de Comptom (1994).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MORFOGÊNESE *IN VITRO*

O estabelecimento do cultivo *in vitro* que se inicia com a preparação da planta matriz a espécie *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. (Figura 2A), a fim de induzir a proliferação múltipla das brotações, foi obtido com o uso do meio de cultura básico MS suplementado com BAP ($0,75 \mu\text{M}$). Consecutivas introduções *in vitro* foram efetuadas para obter uma adequada quantidade de explantes sobreviventes não contaminados em meio de cultura (Fig. 2B). Após este procedimento, foram efetuados sucessivos subcultivos, durante aproximadamente 3 meses, onde obteve-se o estabelecimento asséptico da cultura, em quantidade de material vegetal suficiente para iniciar o delineamento experimental (Fig. 2C). Porém durante o processo, observou-se alta taxa de contaminação nos explantes.

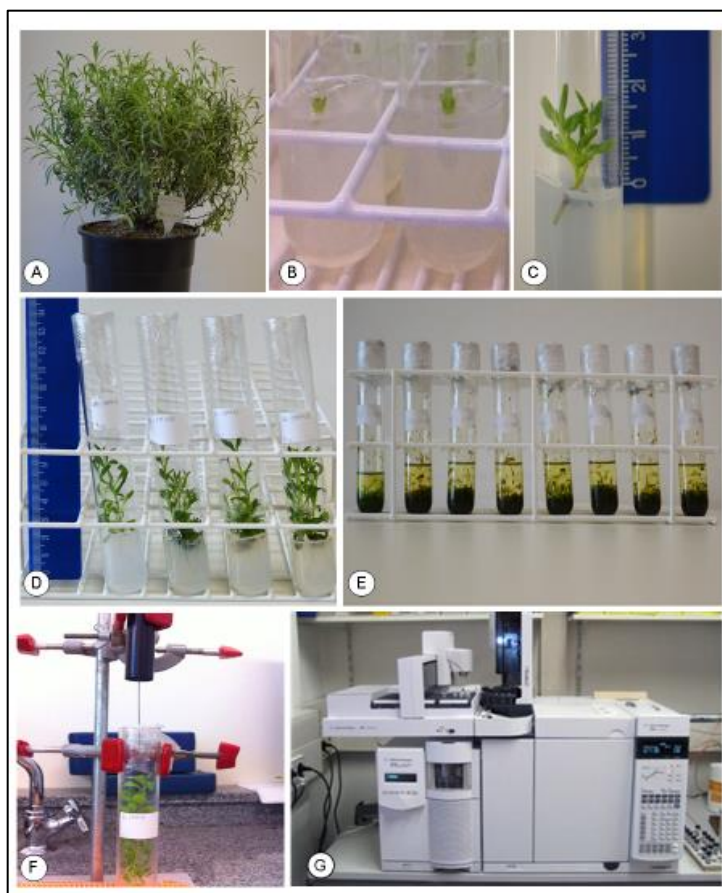


Figura 2. Cultivo *in vitro* de *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. e análise do perfil químico. A) Planta matriz cultivada em ambiente controlado; B) Início do estabelecimento *in vitro*; C) Indução de brotos a partir de explantes nodais, após 20 dias de subcultivo; D) Desenvolvimento de brotos em meio de cultura QL + BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 μM) após 30 dias de subcultivo; E) Início de produção dos extratos com Hexano; F) Microextração em fase sólida de compostos voláteis (SPME); G) Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CGMS).

No período de indução a proliferação de brotos, mesmo após o estabelecimento asséptico da cultura (Fig. 2D), observou-se uma crescente taxa de contaminação durante o subcultivo (Fig. 3). Tal permanência de contaminação sugere que a planta tenha associação com alguma bactéria endógena. Abreu et al., (2002) relatam que a contaminação persistente por bactérias durante a micropropagação ocorre geralmente devido a contaminação endógena dos explantes.

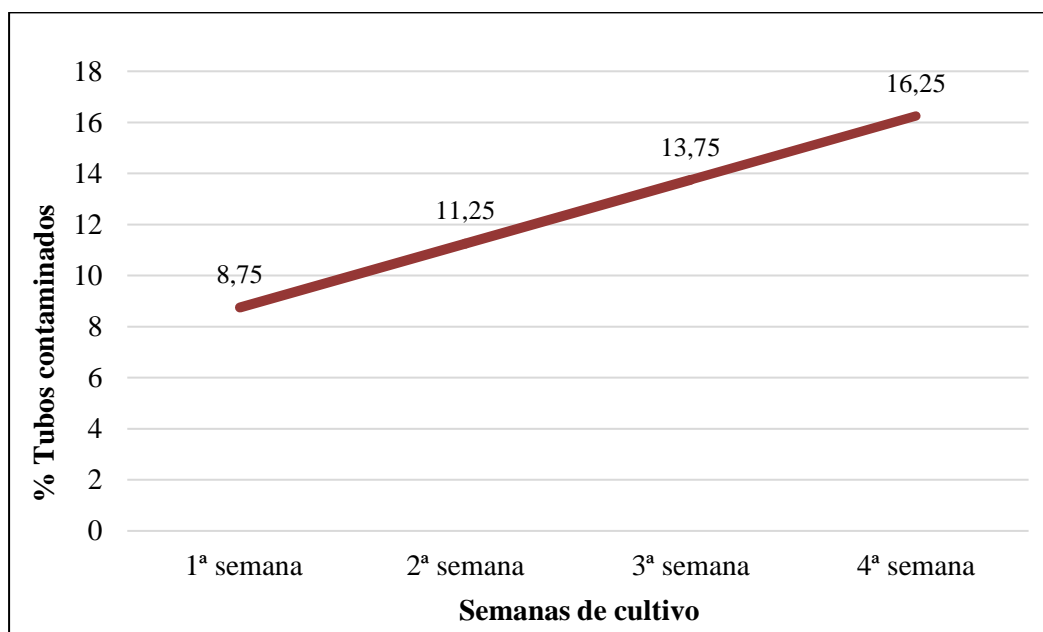


Figura 3. Porcentagem de tubos de ensaio contaminados por bactéria durante o período de cultivo *in vitro* da *Lavandula x intermedia*.

No presente trabalho foi possível observar diferenças significativas entre as médias relacionadas ao número de brotos por tratamento (Fig. 4), onde a maior taxa de multiplicação foi observada quando se utilizou como meio de cultura a formulação salina QL suplementada de 1,5 μM de BAP, quando comparada com o meio MS, porém é semelhante aos demais, após 4 semanas de cultivo. A citocinina BAP tem sido considerada uma das mais efetivas na multiplicação de brotações *in vitro* (SOARES, et al., 2011). Além disso, brotos regenerados em meio contendo a formulação salina QL mostraram-se mais vigorosos e com menor incidência de hiperhidricidade, sugerindo que a menor concentração de sais da formulação salina QL é benéfica para cultivo da *Lavandula* sp.

Diversos trabalhos com lavanda *in vitro* apresentam esse efeito positivo da citocinina sob a taxa de multiplicação. Machado et al., (2013) encontraram as melhores taxas de proliferação de brotações de *L. angustifolia* com 2,0 e 5,0 μM de BAP, porém as maiores porcentagens de hiperhidricidade também foram observadas nessas concentrações, atingindo

100% no quarto subcultivo. Outros autores chegaram a resultados semelhantes em experimentos com lavanda *in vitro*, onde as maiores taxas de multiplicação de brotações, vieram acompanhadas das maiores porcentagens de hiperidricidade (ANDRADE et al., 1999; DIAS et al., 2002).

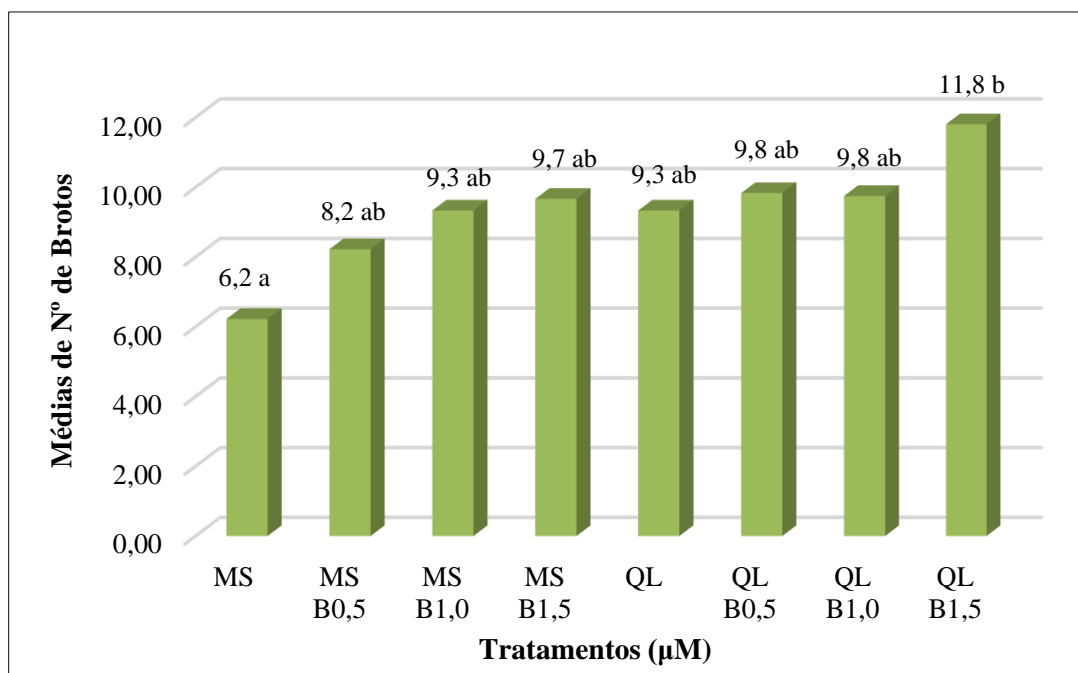


Figura 4. Número médio de brotos de *Lavandula x intermedia* em resposta aos tratamentos que consistem de duas formulações salinas (MS e QL) combinadas com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 µM), após quatro semanas de subcultivo. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada tratamento de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 17,77.

No presente trabalho observou-se a mesma relação do aumento da concentração da citocinina com maiores índices de multiplicação e hiperidricidade, onde a suplementação de BAP (1,5 µM) à formulação salina MS, inferiu em quase 100% de brotos hiperidricos. Outro experimento com *Lavandula* sp. *in vitro* apresentou dados semelhantes, pois o maior número médio de brotos foi observado em meio básico MS suplementado com 1,0 µM de BAP. O aumento da concentração de BAP induziu maior número de brotos hiperidricos, enquanto na ausência de BAP no meio de cultura resultou em maior alongamento de brotos (DAL VESCO et al., 2007).

O efeito das diferentes concentrações de BAP sob a altura média (cm) de brotações *in vitro* desenvolvidas é mostrado na Figura 5. Não foram obtidas diferenças estatísticas significativas, entretanto verifica-se uma tendência de alongamento de brotos na ausência da citocinina (BAP) para ambas formulações salinas (MS e QL).

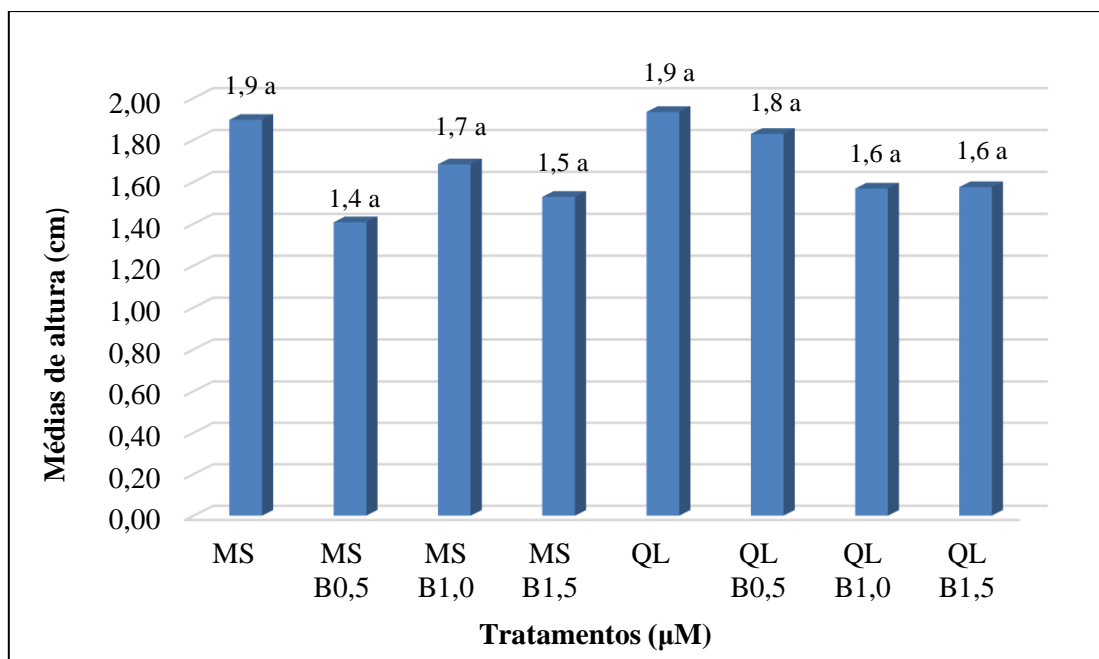


Figura 5. Altura média (cm) de brotos de *Lavandula x intermedia* em resposta aos diferentes tratamentos do meio de cultura: duas formulações salinas (MS e QL) combinadas com quatro diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 µM), após quatro semanas de subcultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o teste SNK ao nível de 5% de probabilidade. CV(%) = 21,12.

3.2 EXTRAÇÕES E ANÁLISES DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Em análises cromatográficas, obtidas pelos extratos, através das macerações das culturas *in vitro* e plantas matrizes, com o uso de Hexano (Fig 2e), obtidas a partir em aparelho CG-MS (Fig 2g), observou-se que o método de extração não havia sido eficiente, pois apenas alguns compostos químicos haviam sido extraídos em pequenas quantidades. Os cromatogramas também demonstraram que nenhum dos compostos voláteis majoritários da lavanda havia sido extraído. Tradicionalmente, várias técnicas são usadas para extrair os componentes químicos voláteis das plantas (ATKINS, 2002). Porém devido a pequena quantidade de material vegetal disponível, as extrações de compostos solúveis em Hexano foram tentativas válidas na busca por uma metodologia ideal, uma vez que as opções eram limitadas.

Afim de utilizar uma segunda técnica para extração dos compostos químicos que não fosse destrutiva e tivesse maior estabilidade operacional, optou-se pela SPME ou microextração em fase sólida. Os compostos voláteis extraídos pela fibra foram submetidos à análise por cromatografia gasosa, revelando os mesmos perfis cromatográficos. Para realizar a avaliação dos mesmos, estudou-se apenas os 3 componentes majoritários dos cromatogramas.

A concentração relativa dos compostos, apresentou algumas porcentagens diferentes entre as amostras analisadas: brotações *in vitro* desenvolvidas nos tratamentos MS + BAP (0 e 1,5 μ M) e QL + BAP (0 e 1,5 μ M) e brotações jovens da planta matriz em condição *ex vitro* de produção, como pode ser observado na tabela 1. que foi construída a partir dos espectros de CG-EM.

Tabela 1. Porcentagem relativa dos componentes majoritários identificados em cada amostra de compostos voláteis extraídos por SPME.

Amostras	Abundância relativa dos compostos majoritários (%)		
	1,8-Cineol	Cânfora	Cariofileno
MS	23,557%	11,519%	8,389%
MS + BAP (1,5 μ M)	23,347%	12,160%	7,570%
QL	20,372%	10,904%	8,376%
QL + BAP (1,5 μ M)	37,347%	13,298%	5,945%
Planta matriz	22,636%	24,265%	4,842%

A porcentagem relativa refere-se à concentração de um composto em relação a outro. Como é difícil injetar no cromatógrafo gasoso a mesma quantidade de amostra, a concentração dos componentes pode variar. Dessa forma optou-se por observar sempre a intensidade de um composto em relação a outro.

Os cromatogramas (Fig. 6 e 7) revelaram que os compostos produzidos pelas brotações de lavanda em todos os tratamentos analisados foram os mesmos. Verificou-se apenas que alguns picos diferem de outros em concentração. A abundância relativa de 1,8-Cineol foi maior para a amostra em meio de cultura com QL + BAP (1,5 μ M). Porém não é possível inferir que esse tratamento modificou a síntese do composto, já que apenas uma extração e análise foram realizadas. O que sugere a necessidade de uma triplicata de análises como forma de eliminar um possível erro experimental.

Uma pesquisa utilizando *Lavandula viridis*, na realização da mesma técnica de microextração em fase sólida (SPME) por *headspace* com brotações micropropagadas e a planta matriz a campo, revelou que 1,8-Cineol e Cânfora foram os compostos mais emitidos (GONÇALVES et al., 2008). Também foram observados alguns resultados positivos quanto ao incremento na produção de compostos orgânicos voláteis sob a influência de citocininas em *Lavandula dentada* (SUDRIÁ et al., 1999).

Estudos com outras espécies de lavanda, demonstraram que o teor de óleos essenciais voláteis detectados *in vitro* são superiores do que os de plantas cultivadas *ex vitro*. O que aponta a importância de tais experimentos para identificação dos fatores que influenciam nas rotas do metabolismo secundário das plantas *in vitro* desenvolvidas. Vale ressaltar que embora os sistemas de defesa das plantas estejam relacionados à adaptação e às exigências do seu ambiente natural, observa-se que eles também podem ser ativados em condições de cultivo *in vitro* (TREAGEAR et al., 2002).

A maior parte dos compostos identificados em todas as amostras, pertencem ao grande grupo dos terpenóides. Sabe-se que estes têm ações terapêuticas (BAKKALI et al., 2008), sugerindo a necessidade de estudos mais aprofundados desta classe de metabolitos secundários, visando à modulação das suas propriedades biológicas e possibilitando a obtenção de protótipos farmacológicos estáveis e seguros.

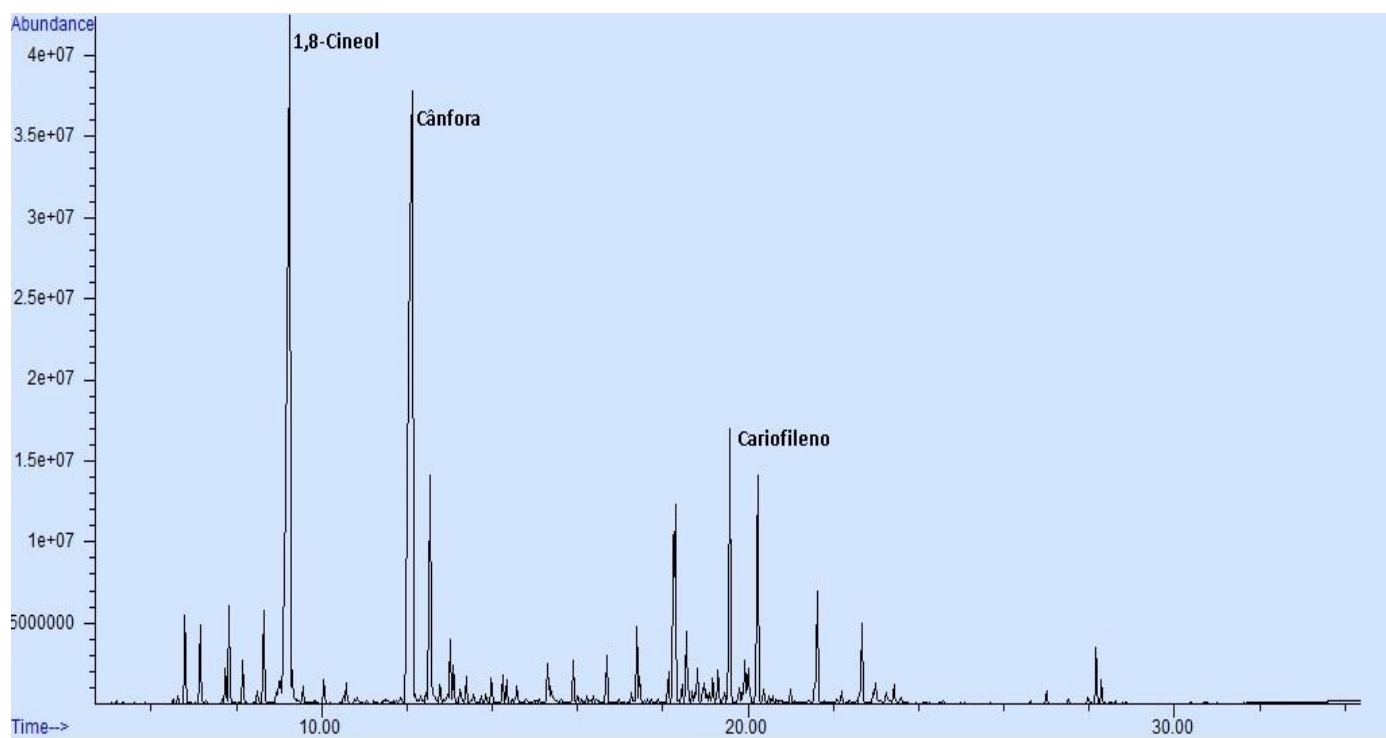


Figura 6. Cromatograma revelando os principais componentes voláteis detectados por SPME das brotações da planta matriz. No eixo vertical são apresentadas as abundâncias e no eixo horizontal o tempo de detecção.

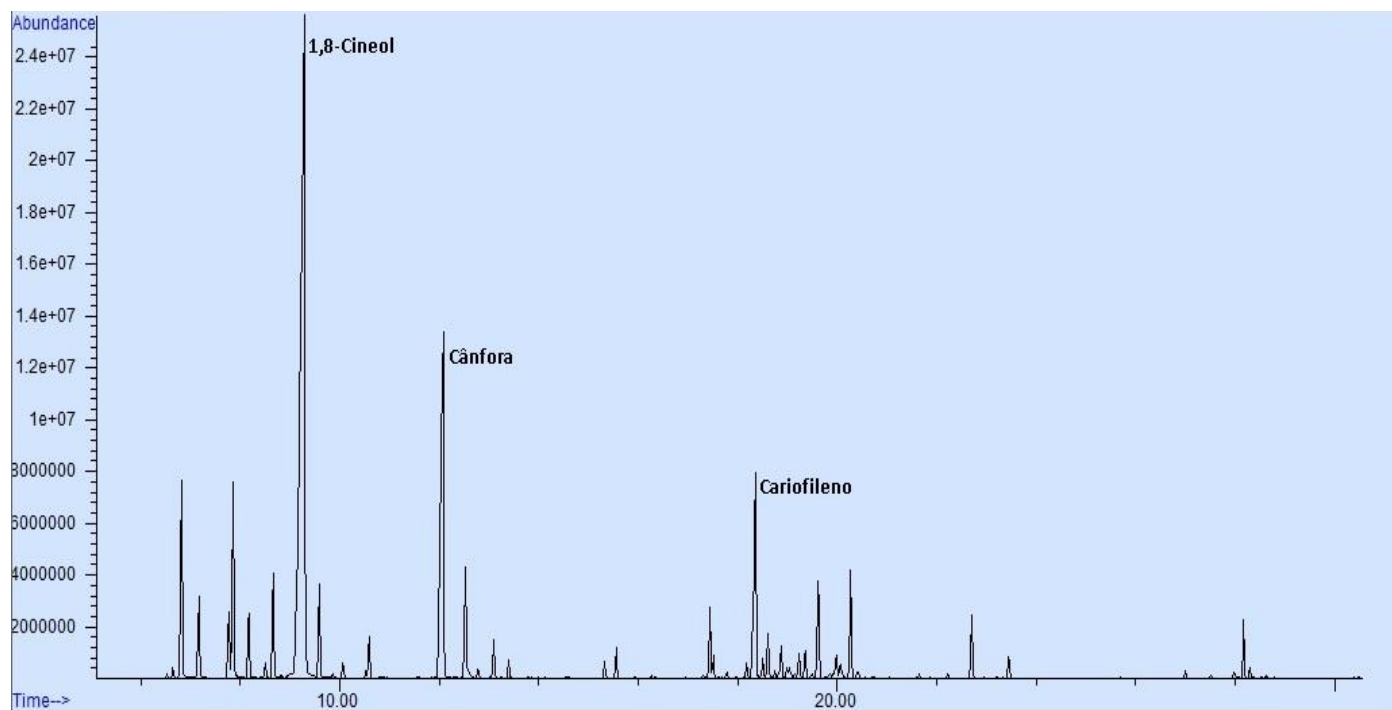


Figura 7. Cromatograma revelando os principais componentes voláteis detectados por SPME das brotações induzidas em tratamento QL BAP (1,5 μ M). No eixo vertical são apresentadas as abundâncias e no eixo horizontal o tempo de detecção.

4 CONCLUSÕES

A contaminação persistente dos explantes durante o cultivo *in vitro* sugere que a planta tenha associação com alguma bactéria endógena.

Para a taxa de multiplicação dos explantes, verificou-se que a formulação salina QL suplementada de 1,5 μ M de BAP inferiu no maior número médio de brotos, quando comparada a formulação MS, porém semelhante aos demais tratamentos. Também foi possível observar que brotos desenvolvidos em meio contendo a formulação salina QL mostraram-se mais vigorosos e menos hiperídricos.

Não foram obtidas diferenças significativas entre as concentrações da citocinina (BAP) com as alturas médias dos brotos. Porém com ausência da citocinina no meio de cultura, verifica-se uma tendência de alongamento dos entre-nós.

A metodologia de extração de compostos solúveis em Hexano mostrou-se não ideal para avaliação de perfil químico das plantas *in vitro* e *ex vitro* amostradas.

Os cromatogramas de SPME revelaram que os compostos voláteis produzidos pelas brotações de lavanda nas condições *in vitro* e *ex vitro* de produção foram os mesmos. Apenas verificou-se uma diferença em quantidade e abundância relativa de componentes, o que infere na necessidade de refazer as análises com repetição de amostras.

O presente trabalho serviu como importante base de conhecimento para o desenvolvimento de pesquisas mais aprofundadas a respeito da produção de compostos químicos de interesse comercial de lavanda.

In vitro* morphogenesis and chemical profile of *Lavandula* sp.*Bruna Vargas Andriolli****Abstract**

The *Lavandula* genus includes more than 30 species and has the world's most important varieties of plants in the essential oil extraction. Currently it is noted that the interest in medicinal and aromatic plants has been increasing greatly. But some species synthesize secondary metabolites in very low concentrations or present great genetic variability and physiological activities, responding differently to environmental conditions, with changes the secondary metabolites making it difficult to obtain a standardized substance. In this context, *in vitro* culture techniques for compounds production of interest to society, have been considered as high-potential systems, since enable standardization of environmental growing conditions, ensuring consistency in obtaining secondary metabolites every subculture. The present study objective was to evaluate the development of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. under different *in vitro* culture conditions, as well as to identify and compare the chemical profile of the volatiles emitted from *in vitro* shoots developed with the *ex vitro* production system when submitted to different methods of extraction. The experiment was conducted in Curitibanos campus of the Federal University of Santa Catarina. We used an two-factorial containing 8 treatments: two salt formulations (MS and QL) combined with four different concentrations of BAP (0; 0,5; 1,0 and 1,5 μ M) for direct organogenesis. The plant material was subjected to extraction with hexane solvent and SPME for analysis of chemical compounds on GC-MS. During the maintenance of *in vitro* culture characteristics were evaluated: number and height (cm) of developed shoots. After the evaluations, a persistent contamination of the explants was observed, suggesting that the plant is associated with some endogenous bacteria. The shoot multiplication rate was higher in the QL (BAP 1.5 μ M) culture medium when compared to the MS medium, but similar to the others. No significant differences were found between the mean heights of the shoots, however, it is noted that the absence of cytokinin in the medium infers in an inter-node elongation. The extraction of compounds using Hexanes, was not ideal for evaluation of the chemical profile of the shoots. Then, SPME was satisfactory regarding the extraction of compounds and analysis of the chemical profile. Chromatograms revealed that the volatile compounds produced by lavender shoots under *in vitro* and *ex vitro* conditions were the same. The present work contributes as an initial basis for later research with chemical profile analysis of lavender.

Key words: *In vitro* culture. Chemical profile. Volatile compounds. SPME. Lavanda.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L.A.; SANTOS, L. de F.; SOUZA, G.A.B. de; MENDES, R.A. O uso de benomil em cultura de tecidos. In: ENCONTRO DE TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 7., 2002, Brasília. Resumo dos Trabalhos. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2002. p.28.
- ANDRADE, Luciana Bavaresco; ECHEVERRIGARAY, Sergio; FRACARO, Fernando; PAULETTI, Gabriel Fernandes; ROTA, Luciana. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n.02, p. 79-83, 1999.
- ATKINS, Peter; PAULA, Julio de. **Físico-Química**, v. 1, n.7, Editora LTC. RJ. p. 211. 2003.
- BAKKALI F.; AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. Biological effects of essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BOURGAUD, Frederic; GRAVOT, Antoine; MILESI, Sandrine. GONTIER, Eric. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p. 839-851, 2001.
- COMPTON, Michael. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.
- DAL VESCO, Lírío Luiz; JACOMEL JÚNIOR, Nelson; CAPRESTANO, Clarissa Alves; HOLDERBAUM, Daniel Ferreira; GUERRA, Miguel Pedro. Micropropagação de Lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 716-720, 2007.
- DE MARTINIS, Bruno Spinoso; RUZZENE, Maria Angela Martins; MARTIN, Carmen Cinira Santos. Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, n. 02, p. 163-168, 2004.
- DIAS, M. C.; ALMEIDA, R.; ROMANO, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, n. 01, p. 99-102, 2002.
- GIACOMETTI, Dalmo C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 19-28.
- GOBBO NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.
- GONÇALVES, S; SERRA, H; NOGUEIRA, J. M. F.; ALMEIDA, R., CUSTÓDIO, L., ROMANO, A. Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n.1, p. 133-136, 2008.

MACHADO, Marília Pereira; DESCHAMPS, Cícero; BIASI, Luiz Antonio. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n. 2, pp. 153-161, 2013.

MCGIMPSEY, J. A.; PORTER, N.G. Lavender: a growers guide for commercial production. New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, 1999.

MENDES, Marta Daniela de Sá. Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal. 2007. 57 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2007.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.473-497. 1962.

QUOIRIN M.; LEPOIVRE R.; BOXUS P., Un premier bilan de dix années de recherche sur les culture de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. C.R. **Recherches Agronomiques**. p. 93-117, 1977.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2001.

SOARES, Helna Passinho; FELIX, Durvalina; KAPLAN, Maria Auxiliadora; PINHEIRO, Marcia Margis; MARGIS, Rogério. Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: inferences from the *Plectranthus* genus. **Planta Medica**. v.72, n.10, p.929-31, 2006.

SOARES, Fernanda Pereira; PAIVA, Renato; ALVARENGA, Amauri Alves; NERY, Fernanda Carlota; VARGAS, Daiane Peixoto; SILVA, Douglas Ramos Guelfi. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 01, p.152-157, 2011.

SUDRIÁ, C., PIÑOL, M., PALAZÓN, J., CUSIDÓ, R. M., VILA, R., MORALES, C., BONFILL, M., CAÑIGUERAR, S. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 58, p. 177-184, 1999.

TREGGAR, J. W., MORCILLO, F., RICHAUD, F., BERGER, A., SINGH, R., CHEAH, S.C., HARTMANN, C., RIVAL, A., DUVAL, Y. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.373, p.1387-1396, 2002.